

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004929

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-102237
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月31日

出願番号
Application Number: 特願2004-102237

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

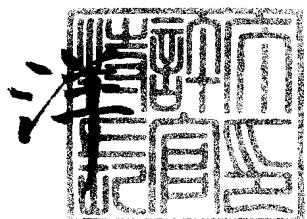
出願人
Applicant(s): 住友ベークライト株式会社
西村 紳一郎

J P 2004-102237

2005年 4月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 PKB04302
【提出日】 平成16年 3月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/545
【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市中央区北9条西16丁目1-1-302
【氏名】 西村 紳一郎
【発明者】
【住所又は居所】 東京都品川区東品川2丁目5番8 住友ベークライト株式会社内
【氏名】 島岡 秀行
【特許出願人】
【識別番号】 000002141
【氏名又は名称】 住友ベークライト株式会社
【代表者】 守谷 恒夫
【特許出願人】
【識別番号】 598107703
【氏名又は名称】 西村 紳一郎
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 003539
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

基板上の少なくとも一部に糖鎖を固定化してなる糖鎖チップであって、基板上にはあらかじめ糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基が導入してあり、該官能基を介して糖鎖が固定化されていることを特徴とする糖鎖チップ。

【請求項 2】

官能基がオキシルアミノ基、ヒドラジド基、及びセミチオカルバジド基から選ばれる少なくとも一つである請求項 1 記載の糖鎖チップ。

【請求項 3】

官能基がオキシルアミノ基である請求項 1 記載の糖鎖チップ。

【請求項 4】

基板上への官能基の導入が、該官能基を有する物質の基板表面へのコーティングによるものである請求項 1 ~ 3 いずれか記載の糖鎖チップ。

【請求項 5】

官能基を有する物質の基板表面へのコーティングが、ラングミュアーブロジェット法による基板表面での分子膜形成である請求項 4 記載の糖鎖チップ。

【請求項 6】

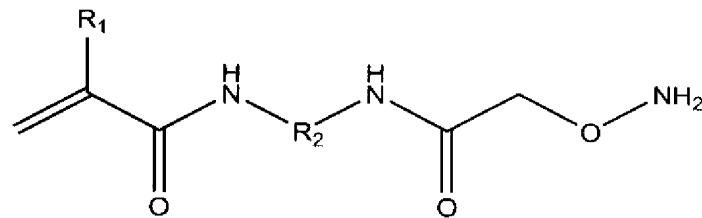
官能基を有する物質がポリマーである請求項 4 又は 5 記載の糖鎖チップ。

【請求項 7】

ポリマーが下記一般式 (1) で表されるモノマー単位を含むものである請求項 6 記載の糖鎖チップ。

【化 1】

(1)



(式中、R₁はH又はCH₃、R₂は任意の分子鎖でヘテロ原子を含んでもよい。)

【請求項 8】

基板上への官能基の導入が、あらかじめ基板上に導入された別種の官能基を介してなる請求項 1 ~ 3 いずれか記載の糖鎖チップ。

【請求項 9】

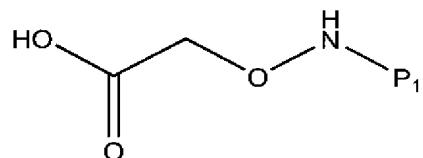
基板上への官能基の導入が、あらかじめ基板上に導入されたアミノ基と、オキシルアミノ基およびカルボキシル基の両方を有する物質との反応による請求項 8 記載の糖鎖チップ。

【請求項 10】

オキシルアミノ基およびカルボキシル基の両方を有する物質が下記 (2) で表されるものである請求項 9 記載の糖鎖チップ。

【化 2】

(2)



(式中, P_1 は任意の保護基を示す。)

【請求項 1 1】

基板がプラスチック製である請求項 1 ~ 1 0 いずれか記載の糖鎖チップ。

【請求項 1 2】

糖鎖のアルデヒド基が、糖鎖の還元末端に由来するものである請求項 1 ~ 1 1 いずれか記載の糖鎖チップ。

【請求項 1 3】

糖鎖のアルデヒド基が、糖鎖を過ヨウ素酸酸化、または、ガラクトースオキシダーゼ処理に代表される酵素処理によって導入されたものである請求項 1 ~ 1 1 いずれか記載の糖鎖チップ。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 いずれか記載の糖鎖チップ上に試料溶液を展開し、該試料溶液に含まれる物質と基板上に固定化された糖鎖との相互作用を定量化する糖鎖チップの使用方法。

【請求項 1 5】

試料溶液に含まれる物質が、血液、血清、細胞破碎物、タンパク質、核酸、酵素、レクチン、ペプチド、ペプチド核酸、抗体、糖鎖、糖タンパク質、糖脂質、およびそれらの誘導体から選ばれるすくなくとも一つである請求項 1 4 記載の糖鎖チップの使用方法。

【請求項 1 6】

相互作用の定量化が、蛍光によるシグナルの検出によるものである請求項 1 4 又は 1 5 記載の糖鎖チップの使用方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 3 いずれか記載の糖鎖チップ上に細胞を播種し、糖鎖と細胞との相互作用を利用して該細胞の分化、増殖、接着、及び変異から選ばれる少なくとも一つの挙動を制御する糖鎖チップの使用方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】糖鎖チップおよびその使用方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖鎖あるいは糖鎖誘導体を固相基板上に固定化したデバイスである糖鎖チップとその使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

糖鎖とは、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸などの单糖およびこれらの誘導体がグリコシド結合によって鎖状に結合した分子の総称である。

糖鎖は、非常に多様性に富んでおり、天然に存在する生物が有する様々な機能に関与する物質である。糖鎖は生体内でタンパク質や脂質などに結合した複合糖質として存在することが多く、生体内の重要な構成成分の一つである。生体内の糖鎖は細胞間情報伝達、タンパク質の機能や相互作用の調整などに深く関わっていることが明らかになりつつある。

例えは、糖鎖を有する生体高分子としては、細胞の安定化に寄与する植物細胞の細胞壁のプロテオグリカン、細胞の分化、増殖、接着、移動等に影響を与える糖脂質、及び細胞間相互作用や細胞認識に関与している糖タンパク質等が挙げられるが、これらの高分子の糖鎖が、互いに機能を代行、補助、增幅、調節、あるいは阻害しあいながら高度で精密な生体反応を制御する機構が次第に明らかにされつつある。さらに、このような糖鎖と細胞の分化増殖、細胞接着、免疫、及び細胞の癌化との関係が明確にされれば、この糖鎖工学と、医学、細胞工学、あるいは臓器工学とを密接に関連させて新たな展開を図ることが期待できる。

その一例として、細胞表面の糖鎖や、糖鎖一レセプター間の相互作用異常による疾病的発生、あるいはエイズなどのウイルス感染における糖鎖の役割等に関する研究が活発化してきている。また、細胞一細胞間相互作用、細胞一マトリックス間相互作用における糖鎖の関与に関する研究も、生体反応を理解する上で重要になってきている（たとえば、非特許文献1）。これらの解析を進める上で、バイオチップが強力な手段となり得る。

【0003】

バイオチップとは、核酸、タンパク質、糖鎖等の生体関連物質、あるいは細胞等を基板上に固定化し、固定化された物質等（プローブと称する）と、生体関連物質あるいはそれ以外の化合物（ターゲットと称する）とを接触させ、生じた特異的な相互作用を検出する生化学的な手法の中で、特に相互作用を大量かつ同時並行的に行うことによりハイスクローリングな検出／解析を可能としたものをいう。具体的には、既に遺伝子機能解析分野で広く利用されるようになってきた基板上に核酸を高密度に固定化し、ハイブリダイゼーションにより相補的な配列の存在を検出するDNAチップ（DNAマイクロアレイ）や、今後利用の期待されるタンパク質を固定化し相互作用する蛋白質を検出するタンパク質チップ（プロテインチップ）などが挙げられる。糖鎖を固定化した糖鎖チップは、糖鎖と糖鎖レセプター、糖鎖と細胞、糖鎖とウイルスなどの相互作用の研究に大いに寄与すると予想されている（たとえば、非特許文献2、3）。さらには、糖鎖チップを感染性疾患や糖鎖異常関連疾患の診断用デバイスとして利用することも期待されている。しかしながら、糖鎖を基板上に効率よく、かつ簡便な操作で固定化する手段はこれまでに無く、解決方法が求められていた。

【0004】

【非特許文献1】コールドスプリングハーバー糖鎖生物学、丸善、2003年

【非特許文献2】Nature (2003, 421, 219-220)

【非特許文献3】Current Opinion in Structural Biology (2003, 13, 637-645)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、基板上に糖鎖を固定化したデバイスである糖鎖チップを、簡便かつ効率的な方法で作製する手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

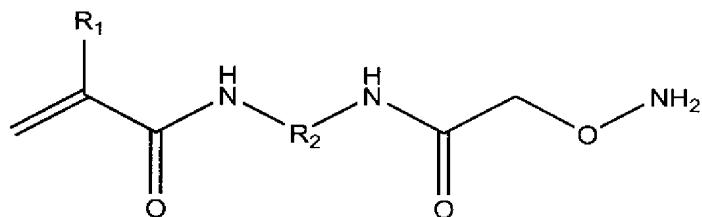
【0006】

本発明は、

- (1) 基板上の少なくとも一部に糖鎖を固定化してなる糖鎖チップであって、基板上にはあらかじめ糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基が導入してあり、該官能基を介して糖鎖が固定化されていることを特徴とする糖鎖チップ、
- (2) 官能基がオキシルアミノ基、ヒドラジド基、及びセミチオカルバジド基から選ばれる少なくとも一つである(1)記載の糖鎖チップ、
- (3) 官能基がオキシルアミノ基である(1)記載の糖鎖チップ、
- (4) 基板上への官能基の導入が、該官能基を有する物質の基板表面へのコーティングによるものである(1)～(3)いずれか記載の糖鎖チップ、
- (5) 官能基を有する物質の基板表面へのコーティングが、ラングミュアーブロジェット法による基板表面での分子膜形成である(4)記載の糖鎖チップ、
- (6) 官能基を有する物質がポリマーである(4)又は(5)記載の糖鎖チップ、
- (7) ポリマーが下記一般式(1)で表されるモノマー単位を含むものである(6)記載の糖鎖チップ、

【化3】

(1)

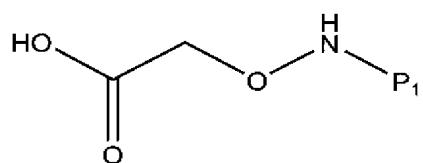


(式中、R₁はH又はC₁H₃、R₂は任意の分子鎖でヘテロ原子を含んでもよい。)

- (8) 基板上への官能基の導入が、あらかじめ基板上に導入された別種の官能基を介してなる(1)～(3)いずれか記載の糖鎖チップ、
- (9) 基板上への官能基の導入が、あらかじめ基板上に導入されたアミノ基と、オキシルアミノ基およびカルボキシル基の両方を有する物質との反応による(8)記載の糖鎖チップ、
- (10) オキシルアミノ基およびカルボキシル基の両方を有する物質が下記(2)で表されるものである(9)記載の糖鎖チップ、

【化4】

(2)



(式中、P₁は任意の保護基を示す。)

- (11) 基板がプラスチック製である(1)～(10)いずれか記載の糖鎖チップ、
- (12) 糖鎖のアルデヒド基が、糖鎖の還元末端に由来するものである(1)～(11)いずれか記載の糖鎖チップ、
- (13) 糖鎖のアルデヒド基が、糖鎖を過ヨウ素酸酸化、または、ガラクトースオキシダ

ーゼ処理に代表される酵素処理によって導入されたものである（1）～（11）いずれか記載の糖鎖チップ，

（14）（1）～（13）いずれか記載の糖鎖チップ上に試料溶液を展開し，該試料溶液に含まれる物質と基板上に固定化された糖鎖との相互作用を定量化する糖鎖チップの使用方法，

（15）試料溶液に含まれる物質が，血液，血清，細胞破碎物，タンパク質，核酸，酵素，レクチン，ペプチド，ペプチド核酸，抗体，糖鎖，糖タンパク質，糖脂質，およびそれらの誘導体から選ばれるすくなくとも一つである（14）記載の糖鎖チップの使用方法，（16）相互作用の定量化が，蛍光によるシグナルの検出によるものである（14）又は（15）記載の糖鎖チップの使用方法，

（17）（1）～（13）いずれか記載の糖鎖チップ上に細胞を播種し，糖鎖と細胞との相互作用を利用して該細胞の分化，増殖，接着，変異から選ばれる少なくとも一つの挙動を制御する糖鎖チップの使用方法，

である。

【発明の効果】

【0007】

本発明の方法にしたがうと、基板上に糖鎖を共有結合で固定化することが可能となり，信頼性が高く実用的な糖鎖チップが実現される。本発明の方法によって作製された糖鎖チップは，たとえば，糖鎖一レセプター間，糖鎖一細胞間，糖鎖一ウイルス間の相互作用の研究，さらには，感染性疾患や糖鎖異常関連疾患の研究用あるいは診断用デバイスとしての利用が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

（糖鎖チップの形態）

本発明において糖鎖チップとは，糖鎖，糖鎖誘導体，糖鎖含有物質など（以下，特記しない限り「糖鎖」と表記する）を固相基板上に共有結合的に固定化したデバイスをいう。

固相基板は平板状であってもよく，それ以外の形状，たとえば，溝加工の施してある平板状，多孔質状，粒子状，中空糸状などであってもよい。また，マイクロタイタープレートのように仕切りを設けた平板状であってもよい。糖鎖は通常，基板上的一部に固定化されていることが好ましいが，全部に固定化されていてもよい。固定化される糖鎖は1種類であってもよく，多種類の糖鎖が固定化されていてもよい。好ましい形態の一つとして，多種類の糖鎖を平板状の基板表面に整列的に固定化した形態（いわゆるマイクロアレイ）が挙げられる。他の好ましい形態の一つとして，1種類あるいはそれ以上の糖鎖を，基板の全面に固定化することが挙げられる。たとえば，マイクロタイタープレートの各ウェルの内壁の全面に糖鎖を固定化する等の形態である。

【0009】

（糖鎖固定化のための官能基）

本発明において糖鎖の固定化は，糖鎖に含まれる官能基と，基板上に導入された官能基との反応により行われる。糖鎖は生体内物質のなかで唯一，アルデヒド基をもつ物質である。すなわち，糖鎖は水溶液などの状態で環状のヘミアセタール型と，非環状型のアルデヒド型とが平衡で存在する。タンパク質や核酸，脂質など糖鎖以外の生体内物質にはアルデヒド基が含まれていない。このことから，アルデヒド基と特異的に反応して安定な結合を形成する官能基を利用すれば，糖鎖を選択的に固定化することが可能である。アルデヒド基と特異的に反応する官能基としては，たとえばオキシルアミノ基，ヒドラジド基，アミノ基，セミチオカルバジド基ならびにそれらの誘導体を好ましく用いることができ，オキシルアミノ基がより好ましい。オキシルアミノ基とアルデヒド基との反応によって生じるオキシム結合は中性付近のpHで安定であるため，好適に使用される。

一般的に，生理活性物質の捕捉・担持にはアミノ基が多用されているが，アミノ基とアルデヒド基の反応によって生じる結合（シップ塩基）は結合力が弱いため，還元剤などを用いた二次処理が必要であることから，オキシルアミノ基の方がより好適であるといえる

【0010】

(糖鎖チップ用基板の作製)

糖鎖チップ用基板は、量産性および表面処理の多様性の観点から、プラスチック製であることが好ましい。測定手段に蛍光を用いる場合には、プラスチックは低蛍光性のものが好ましく、たとえば飽和環状ポリオレフィンなどを好適に用いることができる。

糖鎖チップ用基板の表面には、上述のように糖鎖と結合し得る官能基を導入する必要がある。官能基の導入方法としては、大別して2つの手段が挙げられる。すなわち、(1)官能基を有する物質の基板表面へのコーティングと、(2)基板表面にあらかじめ導入された別種の官能基を介した官能基導入である。以下、それぞれの手段について詳述する。

【0011】

(1) 官能基を有する物質の基板表面へのコーティング

官能基を有する物質としてはポリマーが好ましい。該ポリマーは、糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するモノマーを重合することによって作製することができる。モノマーはビニル系モノマーであることが好ましく、たとえばメタクリル酸誘導体、アクリル酸誘導体、スチレン誘導体、プロピレン誘導体、アクリルアミド誘導体などを好ましく用いることができ、メタクリル酸誘導体がより好ましい。

モノマーは側鎖にオキシルアミノ基を有することが好ましく、該オキシルアミノ基はt-ブトキシカルボニル(BOC)基や9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基などに代表される保護基で保護されていてもよい。オキシルアミノ基とビニル基との間にはスペーサー分子鎖が存在しても良い。特に、酸素原子などを含むスペーサー分子鎖が存在すると、オキシルアミノ基の周囲が親水性環境となり、糖鎖との親和性が向上するため特に好ましい。ポリマーはオキシルアミノ基を有するモノマーの単独重合体であってもよく、他種のモノマー、たとえばアクリル酸およびその誘導体、メタクリル酸およびその誘導体、アクリルアミドおよびその誘導体、スチレンおよびその誘導体などとの共重合体であってもよい。オキシルアミノ基を有するモノマーの重合とは別の手段として、オキシルアミノ基を有しないポリマーに、ポリマー側鎖の官能基などを介してオキシルアミノ基をグラフトする方法も可能である。

コーティングの好ましい形態として、ディップコート法、キャスト法、スピニコート法など一般的な方法を適宜利用することができる。コーティングに用いるポリマー溶液の濃度は、好ましくは0.01～1.0重量パーセント、より好ましくは0.01～5重量パーセントであり、さらに好ましくは0.01～2重量パーセントである。また、他の方法として、ラングミュアープロジェット法を利用して基板表面に単分子膜を形成する方法も利用できる。

オキシルアミノ基が保護基で保護されている場合、コーティング工程の後に適宜、脱保護処理を施す。

【0012】

(2) 基板表面にあらかじめ導入された別種の官能基を介した官能基導入

基板表面に第1の官能基を導入しておき、これを介して糖鎖と結合し得る第2の官能基を導入する方法である。第1の官能基としては、アミノ基、カルボキシル基、水酸基などが好ましい。第1の官能基の導入方法としては、プラズマ照射、官能基含有アルコキシランによるコーティング、官能基含有モノマーの表面グラフト重合などを適宜用いることができる。

次に、第1の官能基を介して第2の官能基を導入する。具体例として、第1の官能基としてアミノ基、第2の官能基としてオキシルアミノ基を導入する場合について記述する。オキシルアミノ基とカルボキシル基の両方を有する分子を基板表面の第1の官能基に作用させることにより、アミノ基とカルボキシル基との縮合反応が生じ、結果としてオキシルアミノ基が基板上に導入される。オキシルアミノ基とカルボキシル基の両方を有する分子としては、たとえばアミノオキシ酢酸などを用いることができる。この際、オキシルアミノ基は保護基で保護されていることが好ましい。基板上のアミノ基と該物質のカルボキシ

ル基は、カルボジイミド化合物に代表される縮合剤の存在下で反応させることが好ましい。オキシルアミノ基が保護基で保護されている場合、オキシルアミノ基導入工程の後に適宜、脱保護処理を施す。

【0013】

(糖鎖の固定化)

基板上への糖鎖の固定化は、糖鎖を含む溶液を基板表面と接触させることにより実現される。好ましい形態の一つは、糖鎖を含む溶液を基板表面に整列的に点着（スポット）する方法である。スポットには点着用のピンを用いたスポットティング方式（たとえば、日立ソフトウェアエンジニアリング（株）製「SPB10」シリーズ）、インクジェット方式（たとえば、Perkin-Elmer社製「Piezorray」）などを適宜利用することが好ましい。糖鎖を溶解するための液体は、水、緩衝液、あるいはその他の溶媒であってもよく、糖鎖以外の添加物を含んでいてもよい。添加物としてはたとえば、界面活性剤、高分子化合物、各種の塩などを挙げることができる。界面活性剤の添加は、糖鎖溶液と基板表面の濡れ性をコントロールする際に有用な方法である。糖鎖溶液のpHは、糖鎖のアルデヒド基と基板表面の官能基との反応に最適な値に調整することが好ましい。いずれの方法においても、固定化する糖鎖は1種類あるいは複数種類であってもよい。

他の好ましい形態の一つとして、糖鎖を含む溶液に基板を浸漬、あるいは、糖鎖を含む溶液を基板表面に展開する方法が挙げられる。この方法は、基板全面に糖鎖を固定化する場合に特に有用である。基板がマイクロタイタープレートのウェルの様に仕切りが設けられた形状である場合には、糖鎖溶液を各ウェルに分注する方法も有用である。いずれの方法においても、固定化する糖鎖は1種類あるいは複数種類であってもよい。

糖鎖を基板上に固定化したのち、固定化されなかった糖鎖を洗浄除去することが好ましい。洗浄のための溶液、洗浄方法などの条件は適宜設定することができるが、たとえば界面活性剤を含む緩衝液または純水、有機溶媒などを用いることが好ましい。

糖鎖と基板との結合は、糖鎖のアルデヒド基と基板上の官能基（たとえば、オキシルアミノ基）との反応によることが好ましい。糖鎖のアルデヒド基は、糖鎖の還元末端に由来するものであってもよく、他の手段により導入されたものであってもよい。他の手段として、たとえばガラクトースオキシダーゼ酸化が挙げられる。この方法は、非還元末端にガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンをもつ糖鎖に適用でき方法であり、ガラクトースの6位のヒドロキシメチルをアルデヒドに変換する。

【0014】

(糖鎖チップの使用形態)

本発明の糖鎖チップの好ましい使用形態の一つとして、糖鎖チップ上に試料溶液を展開し、該試料溶液に含まれる物質とチップ上の糖鎖との相互作用を定量化する方法が挙げられる。この方法は、従来のDNAチップやプロテインチップと同様の使用形態である。試料溶液としては、血液、血清、組織の破碎物あるいは抽出物、細胞の破碎物あるいは抽出物、タンパク質、核酸、酵素、レクチン、ペプチド、ペプチド核酸、抗体、糖鎖、糖タンパク質、糖脂質、およびそれらの誘導体などを含む溶液が挙げられる。試料溶液をチップ上に展開し所定時間反応させたのち、未反応の試料を洗浄除去することが好ましい。試料溶液中にチップ上の糖鎖と相互作用する物質が含まれている場合、該物質は洗浄操作後もチップ上の糖鎖を固定化してある部分（スポット部）に残留する。この残留量を測定することで、糖鎖と試料物質との相互作用の強さを定量化することが可能となる。定量化の手段として、たとえば蛍光物質による標識化、放射性同位体による標識化、各種発色剤による発色、分光学的測定手段、原子間力顯微鏡を用いた物理的測定手段などを用いることができる。測定の容易性、操作の簡便性の観点から、蛍光物質による標識化を利用することが好ましい。

また、糖鎖チップの好ましい使用形態として、糖鎖チップ上に細胞を播種し、チップ上の細胞の挙動を調べる方法が挙げられる。糖鎖の接着性、増殖性、分化能などは糖鎖に影響を受けるとされており、上記の使用方法はたとえば細胞の糖鎖認識能の研究、細胞特異的な培養、幹細胞の分化誘導制御などに有用な手段となる。

【実施例】

【0015】

実施例1

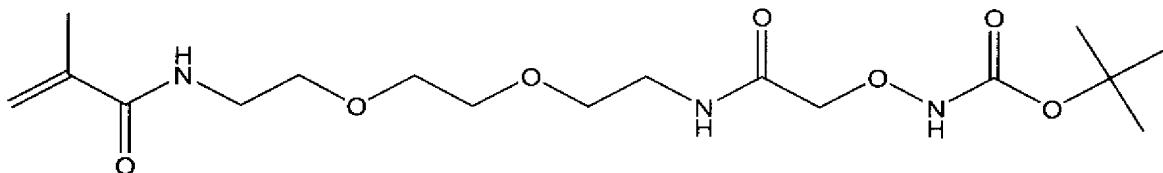
(オキシルアミノ基含有ポリマーの合成)

5 g の無水メタクリル酸（和光純薬工業（株）製）と 25 g の 2, 2'-（エチレンジオキシ）ビス（エチルアミン）（Aldrich 社製）を 200 ml のクロロホルム中で 16 時間反応させた。反応の進行は薄層クロマトグラフィ（TLC）で確認した。反応終了後、シリカゲルクロマトグラフィによる一般的な方法で精製を行ったのち、溶媒を留去した。

生成物を再びクロロホルムに溶解し、10 g の水溶性カルボジイミド（和光純薬工業（株）製）、および、5 g の BOC-アミノオキシ酢酸（Novabiochem 社製）を投入し、室温で 16 時間反応させた。反応の進行は TLC で確認した。反応終了後、純水で 3 回抽出したのち、シリカゲルクロマトグラフィにより精製した。核磁気共鳴分析（NMR）およびマトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間型質量分析器（MALDI-TOF-MS, Bruker 社製 'UltraFlex'）で生成物の確認を行った。合成したモノマーの構造式を下式 1 に示す。

【化5】

(1)



上記の方法により合成したモノマー 1 g およびメタクリル酸メチル（和光純薬工業（株）製）3 g を、還流冷却管を取り付けた反応容器内に投入した。反応容器内に 30 ml のクロロホルムを投入し、反応容器を 65 °C の恒温槽内に設置した。反応容器内の溶液を攪拌しながら、30 分間窒素バージを行った。0.05 g の 2, 2'-アゾビス（イソブチロニトリル）（和光純薬工業（株）製）を反応容器内に投入し、重合反応を開始した。16 時間反応後、反応容器を冷水に浸漬して重合反応を停止し、ポリマー溶液を得た。

【0016】

(基板の作製)

飽和環状ポリオレフィン樹脂を射出成形法で成形し、厚さ 1 mm の平板状の基板を作製した。酸素雰囲気下のプラズマ処理によって基板表面を親水化処理した。

(基板表面へのオキシルアミノ基導入)

上記の基板を前記ポリマー溶液に浸漬し、30 分間静置した。浸漬後、基板を静かに引き上げ、25 °C で 1 時間乾燥した。引き続き、10 % の酢酸を含む 1 M 塩酸に基板を 3 時間浸漬することにより、BOC 基を脱離させた。基板を純水で洗浄し、風乾した。

【0017】

(糖鎖の固定化)

マンノトリオース（Dextra Laboratories 社製）を 10 mg / ml、1 mg / ml、及び 0.1 mg / ml の各濃度で酢酸緩衝液（pH 4, 100 mM）に溶解した。この溶液 1 μl を、上記で作製した基板表面にスポットした。スポット後の基板を保湿したチャンバーに入れ、室温で 1 時間静置した。トリス-塩酸緩衝液（pH 7.4, 10 mM）に 3 重量 % のウシ血清アルブミン（和光純薬工業（株）製）を溶解した。この溶液に静置後の基

板を室温で 1 時間浸漬することにより、基板表面をブロッキングした。ブロッキング後、基板を純水で洗浄し風乾した。

【0018】

(レクチンの反応)

ローダミン標識化コンカナバリン A（フナコシ（株）製）をリン酸緩衝液（PBS, p

. 4, 100 mM) で 20 μ g / ml の濃度で溶解した。この溶液 20 μ l を、プロッキング後の基板上に滴下し、カバーガラスをかぶせ、室温で 1 時間静置した。静置後、基板からカバーガラスを外し、基板を洗浄液 (0.05 重量% の Tween-20 を PBS に溶解したもの) で 3 回洗浄した。基板をさらに純水で洗浄し、風乾した。

【0019】

(測定)

上記工程を経た基板の表面を、マイクロアレイ用スキャナー 'ScanArray LITE' (Packard Biochip Technologies 社製) を用いて測定した。測定条件は、レーザー強度 90 %, PMT 感度 60 %, 励起 / 検出波長はローダミンチャンネルとした。基板表面の蛍光強度を画像化したものを図 1 に示す。

マンノトリオースをスポットした部位のみ蛍光強度が高くなっていることから、この部分にローダミン標識化コンカナバリン A が結合していることがわかる。コンカナバリン A はマンノースを認識して結合することが知られている。よって、マンノトリオースが基板上に固定化されていることが示された。

【0020】

実施例 2

(基板の作製)

飽和環状ポリオレフィン樹脂を射出成形法で成形し、厚さ 1 mm の平板状の基板を作製した。酸素雰囲気下のプラズマ処理によって基板表面を親水化処理した。

(基板表面へのオキシルアミノ基導入)

工程 1: 3-アミノプロピルトリメトキシシランを 2 重量% の濃度で純水に溶解した。この溶液に上記の基板を浸漬した。浸漬は 25 °C で 1 時間行った。浸漬後、基板を純水で洗浄し、乾燥した。これを 45 °C に保った真空乾燥機を用いて真空乾燥した。

工程 2: BOC-アミノオキシ酢酸を 2 重量% の濃度でメタノールに溶解した。さらに BOC-アミノオキシ酢酸に対して 1.5 等量の水溶性カルボジイミド (和光純薬工業 (株) 製) を投入した。この溶液に、工程 1 の基板を浸漬した。浸漬は 25 °C で 12 時間行った。浸漬後、基板をメタノールで洗浄し、乾燥した。引き続き、10 % の酢酸を含む 1 M 塩酸に基板を 3 時間浸漬することにより、BOC 基を脱離させた。基板を純水で洗浄し、風乾した。

(糖鎖の固定化)

実施例 1 と同様の方法で基板上にマンノトリオースを固定化した。

(レクチンの反応)

実施例 1 と同様の方法でローダミン標識化コンカナバリン A を反応させた。

(測定)

実施例 1 と同様の方法で基板表面の蛍光強度を測定した。基板表面の蛍光強度を画像化したものを図 2 に示す。

マンノトリオースをスポットした部位のみ蛍光強度が高くなっていることから、この部分にローダミン標識化コンカナバリン A が結合していることがわかる。コンカナバリン A はマンノースを認識して結合することが知られている。よって、マンノトリオースが基板上に固定化されていることが示された。

【0021】

比較例 1

(基板の作製)

飽和環状ポリオレフィン樹脂を射出成形法で成形し、厚さ 1 mm の平板状の基板を作製した。酸素雰囲気下のプラズマ処理によって基板表面を親水化処理した。オキシルアミノ基導入処理は行わなかった。

(糖鎖の固定化)

実施例 1 と同様の方法で基板上にマンノトリオースを固定化した。

(レクチンの反応)

実施例 1 と同様の方法でローダミン標識化コンカナバリン A を反応させた。

(測定)

実施例 1 と同様の方法で基板表面の蛍光強度を測定した。基板表面の蛍光強度を画像化したものを図 3 に示す。

蛍光強度が高くなっている部分は存在せず、コンカナバリン A が特異的に結合した部位は無いことがわかる。すなわち、マンノトリオースは基板上に固定化されなかったことが示された。

実施例 1, 2 および比較例 1 より、オキシルアミノ基の存在が糖鎖の固定化に重要であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0022】

本発明の方法を用いると、基板上に糖鎖を共有結合で固定化することが可能となり、信頼性が高く実用的な糖鎖チップが実現される。本発明の方法によって作製された糖鎖チップは、たとえば、糖鎖一レセプター間、糖鎖一細胞間、糖鎖一ウイルス間の相互作用の研究、さらには、感染性疾患や糖鎖異常関連疾患の研究用あるいは診断用デバイスとしての利用が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0023】

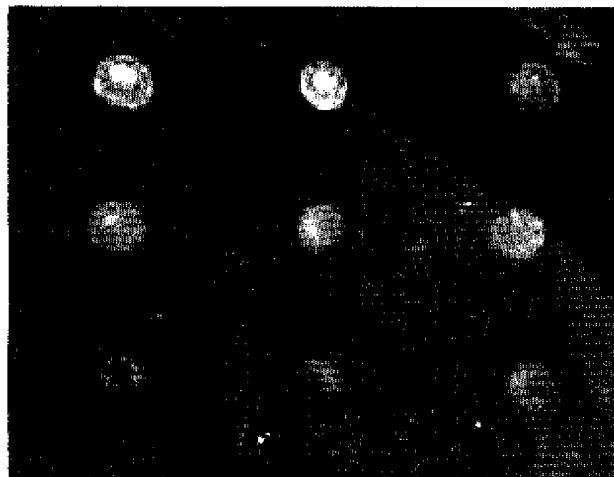
【図 1】実施例 1 の糖鎖チップのマイクロアレイスキャナーによる測定結果。図中、上段の 3 スポットはスポット時のマンノトリオース濃度 10 mg/m l 、中段の 3 スポットは 1 mg/m l 、下段の 3 スポットは 0.1 mg/m l 。

【図 2】実施例 2 の糖鎖チップのマイクロアレイスキャナーによる測定結果。図中、上段の 3 スポットはスポット時のマンノトリオース濃度 10 mg/m l 、中段の 3 スポットは 1 mg/m l 、下段の 3 スポットは 0.1 mg/m l 。

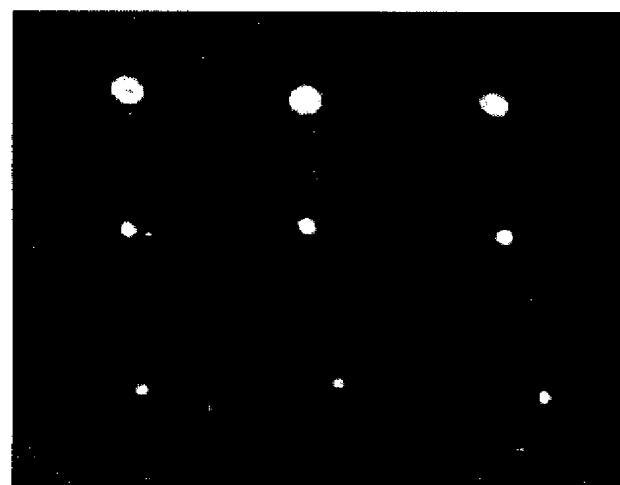
【図 3】実施例 2 の糖鎖チップのマイクロアレイスキャナーによる測定結果。

【書類名】図面

【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】基板上に糖鎖を固定化したデバイスである糖鎖チップを、簡便かつ効率的な方法で作製する手段を提供すること。

【解決手段】固相基板、好ましくはプラスチック基板上にはあらかじめ糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基、好ましくはオキシルアミノ基が導入してあり、該官能基を介して糖鎖が固定化されていることを特徴とする糖鎖チップであり、オキシルアミノ基の導入はオキシルアミノ基含有物質、好ましくはポリマーの基板表面へのコーティング、もしくは、あらかじめ基板上に導入されたアミノ基と、オキシルアミノ基およびカルボキシル基の両方を有する物質との反応による糖鎖チップ。

【選択図】図1

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成16年 4月 5日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2004-102237
【補正をする者】
【識別番号】 598107703
【氏名又は名称】 西村 紳一郎
【手続補正】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 特許出願人
【補正方法】 追加
【補正の内容】
【その他】 本件手続をしたことに相違ありません。

出願人履歴

0 0 0 0 0 2 1 4 1

20021211

住所変更

5 9 2 2 5 8 8 5 6

東京都品川区東品川2丁目5番8号

住友ペークライト株式会社

5 9 8 1 0 7 7 0 3

19980810

新規登録

北海道札幌市中央区北9条西16丁目1-1-302

西村 紳一郎